

## Method of Detecting Risk Factor for Onset of Diabetes

### Background of the Invention

#### Field of the Invention

##### 【0001】

本発明は、疾病の検出方法に関する技術分野の発明である。より具体的には、本発明は、被検者における糖尿病発症危険因子を検出する方法に関する発明である。

##### 【0002】

#### Description of the Related Art

今日、世界中で少なくとも3000万人の糖尿病患者がおり、現在、急速な人口の高齢化に伴い、その患者数は増加している。そして、今後、さらなる患者数増が確実視されている。この傾向は、日本においても例外ではなく、現在、約600万人が糖尿病に罹患しており、その数は、数年後には、1000万人に達するであろうと考えられている。

##### 【0003】

糖尿病は、生体、とりわけ細胞にとっての栄養源であるグルコースが細胞内に取り込まれず、この取り込まれないで血中に滞留しているグルコースが、高血糖状態を惹き起こし、その結果として、尿中にグルコースが排泄される疾患である。

##### 【0004】

この糖尿病には、インスリン依存性糖尿病（I D D M : I型糖尿病）、インスリン非依存性糖尿病（N I D D M : II型糖尿病）及びその他の糖尿病（二次性糖尿病、腎炎等の特定の疾患に伴って発症する糖尿病）に大別される。

##### 【0005】

インスリン依存性糖尿病（I D D M : I型糖尿病）は、比較的若年期に発症し、その発症が急激であり、血中代謝産物としてケトン体が蓄積し、インスリン投与による治療を継続しなければ、生命の維持も危ぶまれる重症の糖尿病である。

##### 【0006】

これに対し、インスリン非依存性糖尿病（N I D D M : II型糖尿病）は、成年期以降に発症するが多く、その病状も耐糖能異常（I G T）状態から徐々に進行し、比較的緩慢であることが多く、治療上、必ずしもインスリンを必要としない糖尿病である。

##### 【0007】

以上のように、糖尿病には大きく2つの病態が存在し、その病状に対する治疗方法も、各々異なる。1997年に、A m e r i c a n D i a b e t e s A s s o c i a t i o n (A D A) は、新しい糖尿病の分類と診断基準を発表した。日本でも、同様に、糖尿病の概念、分類、診断基準が検討されているが、この新しい分類では、糖尿病の成因と病態を組み合わせることを基本としている。病態は、概ね前述した通りであり、今後は、糖尿病の診断と分類上、糖尿病の成因を明らかにすることがますます重要になってくる。そして、この新しい分類で、最も注目すべきことは、第3のカテゴリーである「他の特殊な病型」の中に、遺伝子異常による糖尿病が組み込まれたことである。

##### 【0008】

糖尿病発症遺伝子として、現在までに、インスリン、インスリン受容体、グルコキナーゼ（M O D Y 2）、H N F - 4  $\alpha$ （M O D Y 1）、H N F - 1  $\alpha$ （M O

DY3)、ミトコンドリアの遺伝子異常等等が知られている。しかし、これらのいずれの遺伝子異常も、その頻度は低い。すなわち、これらの遺伝子異常の中では、比較的高頻度であるミトコンドリア遺伝子の3243番目の塩基であるアデニンからグアニンへの変異で、NIDDMの1%未満、他の部位の変異を含めたミトコンドリア遺伝子の異常全体でも2%程度の頻度と考えられている。従って、前述した遺伝子変異は、膨大な数の糖尿病患者のごく一部について説明し得るだけであることは否めない。また、糖尿病は、単一の遺伝子異常を持つだけで発症するのではなく、複数の遺伝子の異常や環境要因が加わり発症するという考え方が一般的である。

#### 【0009】

このような観点から、糖尿病の発症にかかわる原因遺伝子、あるいは発症危険因子を探索し、見出すことは、糖尿病を診断することばかりではなく、早期に発症する可能性の高い個体を選別し、発症を遅延させることが可能であり、ひいては、その発症メカニズムを解明する糸口となり、さらに、より適切な糖尿病の治療法を見出す助けるとなる。

#### 【0010】

##### Summary of the Invention

本発明が解決しようとする課題は、1) 個体が、現に罹患している糖尿病の病型を知り、2) たとえ個体が健常人であっても、将来、糖尿病を発症する素因を有しているか否か、さらには、罹患するとしたら、いずれの病型の糖尿病であるか等〔以上1) 2) を、本発明においては、「糖尿病発症危険因子」ともいう〕を予見することを可能にする危険遺伝子を見出し、その危険遺伝子を利用して、糖尿病発症危険因子の検出手段を提供することにある。

#### 【0011】

本発明者は、この課題の解決に向けて、その解析により、糖尿病発症危険因子を検出可能な危険遺伝子の検索を行った。その結果、膵臓のランゲルハンス島 $\beta$ 細胞において、グルコース刺激によるインスリン分泌を促すセカンドメッセンジャーである、サイクリックADPリボース(cADPR)の産生及び水解酵素であるCD38をコードする遺伝子(以下、CD38遺伝子ともいう)の異常が、糖尿病の発症を誘因することを見出し、この遺伝子こそが、これを用いることにより、糖尿病発症危険因子を検出することが可能な危険遺伝子であることを見出して、本発明を完成した。

#### 【0012】

すなわち、本発明は、CD38遺伝子における遺伝子の異常を検出することにより、個体における糖尿病発症の遺伝的な素因(危険因子)を検出する方法(以下、本発明検出方法という)を提供する。

#### 【0013】

CD38遺伝子がコードするCD38タンパク質は、もともとは、ヒトリンパ球表面マーカーの一つとして同定されていたタンパク質である。そして、このCD38タンパク質と生体における糖代謝との間に、実に深い関係が認められるることは、本発明者でもある、岡本及び高澤らの長年の研究により見出されたものである。

#### 【0014】

##### Brief Description of the Drawings

【図1】CD38遺伝子のエクソン2におけるDGGE法による、遺伝子変異解析の異常バンドパターンを示した図である。

【図2】CD38遺伝子のエクソン3におけるDGGE法による、遺伝子変異

解析の異常バンドパターンを示した図である。

【図3】CD38遺伝子のエクソン4におけるDGGE法による、遺伝子変異解析の異常バンドパターンを示した図である。

【図4】CD38遺伝子のエクソン7におけるDGGE法による、遺伝子変異解析の異常バンドパターンを示した図である。

【図5】CD38遺伝子のエクソン8におけるDGGE法による、遺伝子変異解析の異常バンドパターンを示した図である。

【図6】CD38遺伝子のエクソン2におけるDGGE法による、異常バンドパターン例におけるダイレクトシークエンス法による塩基配列の同定について、示した図面である。

【図7】CD38遺伝子のエクソン3におけるDGGE法による、異常バンドパターン例におけるダイレクトシークエンス法による塩基配列の同定について、示した図面の一方である。

【図8】CD38遺伝子のエクソン3におけるDGGE法による、異常バンドパターン例におけるダイレクトシークエンス法による塩基配列の同定について、示した図面の他方である。

【図9】CD38遺伝子のエクソン4におけるDGGE法による、異常バンドパターン例におけるダイレクトシークエンス法による塩基配列の同定について、示した図面の一方である。

【図10】CD38遺伝子のエクソン4におけるDGGE法による、異常バンドパターン例におけるダイレクトシークエンス法による塩基配列の同定について、示した図面の他方である。

【図11】CD38遺伝子のエクソン7におけるDGGE法による、異常バンドパターン例におけるダイレクトシークエンス法による塩基配列の同定について、示した図面である。

【図12】CD38遺伝子のエクソン8におけるDGGE法による、異常バンドパターン例におけるダイレクトシークエンス法による塩基配列の同定について、示した図面である。

【図13】CD38遺伝子のエクソン3 Arg140Trp変異を、PCR-RFLP法で判定した結果を示した図面である。

【図14】CD38遺伝子のエクソン7 Ser264Leu変異を、PCR-RFLP法で判定した結果を示した図面である。

【図15】CD38遺伝子のイントロン7-28G/A変異を、PCR-RFLP法で判定した結果を示した図面である。

#### Detailed Description of the Preferred Embodiment

##### **【0015】**

以下、本発明の実施の形態の説明に先立ち、本発明の主要な要素でもある、CD38遺伝子ないしCD38タンパク質の、生体における糖（グルコース）代謝との関係について説明する。

##### **【0016】**

グルコースは、膵ランゲルハンス島 $\beta$ 細胞におけるインスリンの分泌において、最も重要な刺激物質である。インスリンの分泌においては、グルコース刺激により、細胞内の $Ca^{2+}$ 濃度が上昇し、これが引き金になってインスリンの分泌がなされるものと考えられている。この細胞内の $Ca^{2+}$ 濃度の上昇は、細胞外からの $Ca^{2+}$ の流入と、細胞内プールからの $Ca^{2+}$ の動員によりもたらされる。細胞外からの流入については、Ashcroftらの「ATP感受性 $K^+$ 」

チャンネル学説による説明が広くなされており、この分子機構についても、稻垣、清野らにより、詳細な説明が既になされている（生化学、69：1067-1080, 1997）。

### 【0017】

一方、細胞内プールからの $\text{Ca}^{2+}$ の動員については、ヒトインスリン産生細胞を用いた実験から、細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇に関して、細胞外からの流入と同時に、それよりも早期に関与していることが指摘されている (Rojas E, et al., Endocrinology, 134:1771-1781, 1994)。また、イノシトール 1, 4, 5 三リン酸 (IP<sub>3</sub>) が、多くの細胞で、 $\text{Ca}^{2+}$ 動員のセカンドメッセンジャーとして機能していることが報告されている。インスリン産生細胞においても、 $\text{Ca}^{2+}$ 動員のセカンドメッセンジャーとして、IP<sub>3</sub>が重要な役割を果たしていることが示唆されていた。

### 【0018】

本発明者である岡本らは、ストレプトゾトシン等のインスリン産生 $\beta$ 細胞障害物質によって、DNA損傷が惹き起こされ、その結果、pol y (ADP-ribose) 合成酵素が活性化され、細胞内のNAD<sup>+</sup>が枯渇すると、 $\beta$ 細胞のインスリン産生機能が低下し、pol y (ADP-ribose) 合成酵素阻害物質によって、細胞内のNAD<sup>+</sup>濃度の低下を阻止すると、 $\beta$ 細胞のインスリン産生機能が維持されることから、この細胞のインスリン産生機能の維持に、同細胞内のNAD<sup>+</sup>量の維持が必須であることを明らかにしている (Yamamoto H, et al., Nature, 294:284-286, 1981; Okamoto H, et al., 1990, in Molecular Biology of the Islets of Langerhans, Okamoto H, ed, pp. 209-231, Cambridge University Press, Cambridge; Okamoto H, et al., Biochimie, 77:356-363, 1995)。このような背景から、本発明者である岡本及び高澤らにより、グルコースによるインスリン分泌における機構において、インスリン産生細胞の機能の発現に、NAD<sup>+</sup>から作られるcADPRが機能している可能性が示唆された。

### 【0019】

すなわち、ラット臍ランゲルハンス島から調製したミクロソームにおける、Flu o 3を用いた、 $\text{Ca}^{2+}$ の放出に着目した実験においては、cADPRは、ランゲルハンス島のミクロソームから、 $\text{Ca}^{2+}$ の放出を惹き起こし、連続的な添加により、 $\text{Ca}^{2+}$ 放出応答のattenuationが確認され、一方、このランゲルハンス島のミクロソームからのIP<sub>3</sub>の添加による $\text{Ca}^{2+}$ の放出は起こらないことから、cADPRによるランゲルハンス島のミクロソームからの $\text{Ca}^{2+}$ の放出は、IP<sub>3</sub>による $\text{Ca}^{2+}$ 放出とは異なることが、本発明者である高澤及び岡本らにより示された (Takasawa S, et al., Science, 259:370-373, 1993)。また、cADPRに対する抗体を用いたラジオイムノアッセイによる実験により、グルコース刺激によるインスリン産生細胞のcADPR量が増加することも、高澤及び岡本らにより示されたことから (Takasawa S, et al., J Biol Chem, 273:2497-2500, 1998)、インスリン産生細胞におけるグルコース刺激により生じる $\text{Ca}^{2+}$ の動員は、主に、cADPRによると考えられている。

### 【0020】

さらに、高澤及び岡本らは、CD38タンパク質は、NAD<sup>+</sup>を基質にするとcADPRを生成するADP-ribosyl cyclase活性を示し、cADPRを基質にすると、ADPRを生成するcADPR水解酵素活性を示すことを示した (Takasawa S, et al., J Biol Chem, 268:26052-26054, 1993)。このcADPR水解反応は、2~8mMのATPによって、濃度依存的に抑制され、NAD<sup>+</sup>を基質にすると、ATP濃度に依存してcADPRの生成量が増加することが認められている。このATPによるcADPR水解酵素の活性を抑制する分子機構

は、CD38タンパク質のcADPR結合部位である、Lys-129に、ミリモル単位の濃度のATPがcADPRと競合することによるものであることが、Tohgo A, Takasawa S, et al., J Biol Chem, 272:3879-

3882, 1997)。実際に、インスリン産生細胞のATP濃度は、グルコースの刺激により、2~8 mMの範囲で変化することが報告されており、インスリン産生細胞にCD38タンパク質が存在すれば、cADPRの量の変化は、ATPによるCD38タンパク質のcADPR分解活性の抑制という機構で説明されている。

#### 【0021】

また、高澤及び岡本らは、加藤らと共に、臍ラングルハンス島β細胞に、CD38タンパク質を過剰発現するトランスジェニックマウスにおいては、グルコースに応答するインスリン分泌が、対照のマウスに比して有意に亢進していることを示した (J. Biol. Chem. 270, 30045-30050, 1995)。

#### 【0022】

上述したように、インスリン産生細胞において、グルコースの刺激により生じたATPによって、CD38タンパク質のcADPR分解活性が抑制され、この結果、cADPR量が上昇し、細胞内のCa<sup>2+</sup>プールであるミクロソームから、Ca<sup>2+</sup>が動員されて、インスリン分泌が起こるものと考えられている。

#### 【0023】

さらに、岡本及び高澤らが、cADPRによるCa<sup>2+</sup>放出機構について、cADPRによるCa<sup>2+</sup>放出がリアノジンによるCa<sup>2+</sup>放出とcross-desensitizationが認められることを明らかにしたことから、小胞体のリアノジン受容体(タイプ2)を介すると考えられている。そして、臍ラングルハンスβ細胞では、Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン(CaM)依存性リン酸化酵素IIが、cADPR感受性のCa<sup>2+</sup>放出チャネルである、小胞体リアノジン型Ca<sup>2+</sup>放出チャネルをリン酸化し、これによりcADPRによるCa<sup>2+</sup>放出の感受性が増大し、グルコース刺激により増大したリアノジン型Ca<sup>2+</sup>チャネルから、Ca<sup>2+</sup>放出を惹き起こしてインスリン分泌が起こることを、高澤及び岡本らは明らかにした (J. Biol. Chem. 270, 30257-30260, 1995)。さらに、高澤及び岡本らは、正常マウスでは、主に、cADPRによるCa<sup>2+</sup>放出が認められるが、ob/obマウスでは、IP<sub>3</sub>によるCa<sup>2+</sup>の放出が優位に起こることを明らかにした (Takasawa S, et al., J Biol Chem, 273:2497-2500, 1998)。

さらに、poly(ADP-ribose)ポリメラーゼ(PARP)を、ジーンターゲッティングにより欠損したマウスにおいて、ストレプトゾトシンによる糖尿病の発症に対して抵抗性を示すことが報告されていることから、インスリン産生における、細胞内のNAD<sup>+</sup>

の枯渇や消費が、糖尿病を惹き起こすことも示唆されている (Burkart V, et al., Nature Med, 5:314-319, 1999)。すなわち、NAD<sup>+</sup>を基質とするcADPRの産生、細胞内Ca<sup>2+</sup>の動員、インスリン分泌の過程が、インスリン産生細胞において重要であり、この過程にCD38遺伝子ないしCD38タンパク質が、非常に深く係わっていることを、本発明者でもある、岡本及び高澤らは、明らかにしている。ただし、CD38遺伝子が、糖尿病の発症と深く関連しているからといって、このCD38遺伝子の遺伝子異常を、糖尿病発症危険因子の検出に用い得るという見解は、すでに報告されている糖尿病に関する遺伝子の異常が、糖尿病発症危険因子の検出マーカーとして、臨床現場においては必ずしも有用でないことからも、極めて驚くべきことであった。

#### 【0024】

具体的に、本発明検出方法において、利用され得ることが判明しているCD38遺伝子における遺伝子異常部位の主なものとして、①CD38遺伝子によってコードされるCD38タンパク質の140番目のアルギニンをコードする部位、

②同264番目のセリンをコードする部位及び③イントロン7の-28番目のグアニンが挙げられる（これらの遺伝子異常部位における変化は、各々が独立であって相互に連鎖はしていない）。なお、これらの遺伝子異常部位についての詳細は、後述の実施例において記載する。

#### 【0025】

以下、発明の実施の形態について説明する。

上述したように、本発明は、糖尿病発症の危険遺伝子であるCD38遺伝子における遺伝子異常を検出することを前提とする、糖尿病発症危険因子の検出方法である。

#### 【0026】

CD38遺伝子及びこれがコードするCD38タンパク質については、すでに解析がなされている [Nata K. et al., Gene, 186:285-292, 1997  
:配列番号1 (塩基配列とアミノ酸配列) , 配列番号2 (アミノ酸配列) ] 。

#### 【0027】

このCD38遺伝子の遺伝子変異と、糖尿病発症危険因子との相関関係を具体的に解析することにより、本発明検出方法において利用し得る、CD38遺伝子の遺伝子変異を見出すことができる。すなわち、「糖尿病患者と健常人」、「インスリン依存性糖尿病とインスリン非依存性糖尿病」等の組み合わせにおいて、CD38遺伝子の変異部位と変異頻度、あるいはその変異により生ずるタンパク質の機能を解析することにより、所望する遺伝子変異を見出すことができる。かかる作業の実際については、後述する実施例において、具体的に記載する。

#### 【0028】

なお、本発明において、「遺伝子変異」とは、ヒト染色体における遺伝子の変異を意味するものであり、遺伝子の塩基配列が野生型（正常遺伝子の塩基配列）と異なる場合のことを意味するものである。また、遺伝子が、その塩基配列において、個体毎に異なる特異的な部位を保有している場合には、一般的にこれは、「遺伝子多型」として表現され得るが、本発明においては、この「遺伝子多型」も「遺伝子変異」の範疇に含まれるものとする。「遺伝子変異」は、その遺伝子の変異頻度、そのmRNAの発現量、タンパク質発現量、あるいはタンパク質の機能等の多角的な解析により、同定される。平均して、数百塩基に1個程度、そのような「遺伝子変異」が存在すると考えられているが、遺伝子を直接的又は間接的に解析することにより、これを同定することが可能であり、また、その見出された遺伝子変異の家系における解析から、父方由来の染色体（アレル）と母方由来の染色体（アレル）とを判別することができる。

#### 【0029】

遺伝子変異部位における変化には、父方と母方由来の遺伝子のいずれかが、遺伝子変異部位において、塩基配列に置換が生じており、両者のアレルの遺伝子が、野生型の遺伝子の塩基配列と比較して、異なる塩基との置換が起こっている場合を「ホモ接合体」、同様に片方のアレルの塩基配列が野生型の塩基配列と比較して、異なる塩基との置換が起こっている場合を「ヘテロ接合体」として認めるものである。

#### 【0030】

本発明者は、後述するように、現在までに、CD38遺伝子において見出され、糖尿病発症危険因子と相関関係が認められる遺伝子異常部位として、①CD38遺伝子によってコードされるCD38タンパク質の140番目のアルギニンをコードする部位における遺伝子変異（例えば、エクソン3領域における制限酵素TspRIに対する感受性の有無として特定される）、②同264番目のセリンをコードする部位における遺伝子変異（例えば、エクソン7領域における制限酵素TaqIに対する感受性の有無として特定される）及び③イントロン7の-28番目のグアニンにおける遺伝子変異（例えば、イントロン7領域（エクソン8

領域)における制限酵素  $T_{ru9I}$  に対する感受性の有無として特定される]、を見出している。

【0031】

遺伝子異常部位における変化の検出方法としては、通常公知の方法、例えば、サンプルプロット法を用いた RFLP 法や、PCR-RFLP 法、HET (hetero duplex analysis) 法、DGGE 法 (denaturing gradient gel electrophoresis) 法、DS (direct sequence) 法、CCM (chemical cleavage mismatch) 法、CDI (carbodiimid modification) 法、さらには PCR 法を用いた一本鎖 DNA 高次構造多型解析法 [PCR-SSCP (single-stranded conformation polymorphism) 法、以下、本明細書においては SSCP 法という]、PCR/GC-clamp 法等を用いることができる [例えば、バイオマニュアルシリーズ 1、遺伝子工学の基礎技術、山本 雅編、羊土社 (1993) 等を参照のこと、特に、PCR/GC-clamp 法については、Myers, R. M., Sheffield, V., and Cox, D. R. (1988) in Genomic Analysis: A Practical Approach. K. Davies, ed. IRL Press Limited, Oxford, pp. 95-139

等を参照のこと] が、簡便かつ正確に遺伝子異常を特定し得るという点において、PCR/GC-clamp 法を選択することが好ましい。

【0032】

なお、PCR/GC-clamp 法は、DGGE 法 (DNA 変性剤の直線的な濃度勾配をつけたポリアクリルアミドゲルにおける、塩基置換を含む一本鎖 DNA 断片と含まない一本鎖 DNA 断片の、DNA を変性させるべき DNA 変性剤濃度の相違に基づく移動度の差異を利用して、DNA の塩基置換を検出する方法) の変法であり、DGGE 法における、「複数の塩基置換がある場合に、ポリアクリルアミドゲルにおいて、最後に融解するドメインの塩基置換を検出することができない」という欠点を、GC 含量の高い領域 (GC-clamp) を、塩基置換の検出対象である DNA 断片につなげることにより克服した方法である [Sheffield, V. C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:232-236 等を参照のこと]。

【0033】

よって、PCR/GC-clamp 法の基本的操作等は、DGGE 法に準ずる [PCR/GC-clamp 法と同様に、Myers, R. M., Sheffield, V., and Cox, D. R. (1988) in Genomic Analysis: A Practical Approach. K. Davies, ed. IRL Press Limited, Oxford, pp. 95-139 等を参照のこと] が、塩基置換検出の対象となる DNA 断片に、GC-clamp を付加する工程が必要となる。

【0034】

本発明検出方法における、CD38 遺伝子の遺伝子異常部位における変化の検出の対象となる DNA の出所は、特に限定されるべきものではなく、被検者の体細胞であれば、特に限定されない。例えば、末梢血や白血球等の血液検体を、本発明において好適に選択することができる。

【0035】

被検者の検体細胞から、公知の方法を用いてゲノム DNA を抽出し、このゲノム DNAにおいて、特定の遺伝子異常部位における変化 (具体的には、特定の遺伝子異常部位における塩基の置換) を検出する。

【0036】

そして、この検出作業の結果、特定の遺伝子の異常部位に変化が認められた場合、被検者の臨床症状を鑑みて、被検者の糖尿病発症危険因子を検出することができる。

### 【0037】

すなわち、被検者が、既に糖尿病を罹患している場合においては、その糖尿病の主な原因を特定することが可能になる。さらに、その病態がインスリン非依存性糖尿病であるときには、これがインスリン依存性糖尿病へと移行する可能性を予測することが可能であり、その結果、病態に対応した治療あるいは予防的措置を講ずることや、最適な治療方法の開発を行うことが可能となる。

### 【0038】

また、被検者が糖尿病を発症していない場合、あるいは異なる検査の結果、あるいは家族歴等からその危険群である場合には、特定の遺伝子異常部位の変化を、その被検者の遺伝的な糖尿病体质の根拠として用いて、適切な糖尿病発症の予防的措置（例えば、運動や食事の内容についての指導）を行うことによって、その被検者の糖尿病の発症を予防することも可能である。

### 【0039】

【実施例】以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが、この実施例により、本発明の技術的範囲を限定することを意味するものではない。

#### CD38遺伝子解析

##### 対象

日本糖尿病学会の診断基準に基づいて、糖尿病と診断された240例を対象に、DGGE法によるCD38遺伝子の変異の解析を行った。

### 【0040】

#### ゲノムDNAの抽出

健常人及び糖尿病患者のゲノムDNAは、抗凝固剤EDTA 3Kを含む真空採血管を用いて患者の末梢血を採取した後、QIAamp Blood Kit (QIAGEN社)を用いて、ゲノムDNAを抽出した。

### 【0041】

#### DGGE解析用PCRプライマーおよび泳動条件の設定

ヒトCD38タンパク質(ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase)をコードする遺伝子の塩基配列(配列番号1)は、DDBJ/EMBL/GenBankデータベースACCESSION D84278~84(Nata, K., et al.,)より入手した。

### 【0042】

CD38遺伝子の各エクソンを、PCR法にて増幅するためのプライマー設定は、コンピューターソフトGENETYX-MAC(ソフトウェア一開発社)を用いて行った。また、設定したプライマーを用いて増幅した、PCR断片中の融解ドメインの融解特性(ドメインの位置と融解温度など)の推定にはコンピューターソフトMac Melt(日本バイオラッド社)を使用した。演算によって得られた融解特性より、GCクランプをどちらのプライマーに付加するかを決定し、さらに、そのPCR断片の分析に適した変性剤の濃度範囲を決定した。

### 【0043】

ここに、CD38遺伝子の各エクソンの増幅に用いたPCRプライマーの塩基配列を記載する。

#### エクソン1

5'  
-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG  
CCG CCC CCG CCC GAT CTT CGC CCA GCC  
AAC CCC G-3' (Forward:配列番号3)  
5' -ACC GGT GCG CCT TAG TCG CCA-3',  
(Reverse:配列番号4)

#### エクソン2

5' - TAG ACT GCA TGT TAG ACG AGA - 3'  
 (Forward : 配列番号 5)  
 5'  
 - CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG  
 CCG CCC CCG CCC GTT TGG ACC TAT GAA  
 TTG TTA CC - 3' (Reverse : 配列番号 6)  
エクソン 3

5' - GAC ATG CTA AAT TGA TCT CAG - 3'  
 (Forward : 配列番号 7)  
 5'  
 - CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG  
 CCG CCC CCG CCC GCA GCA GAA GTC ACT  
 CTG TTC - 3' (Reverse : 配列番号 8)  
エクソン 4

5' - CCA TTC TCC AGC CTC CGT CTT - 3'  
 (Forward : 配列番号 9)  
 5'  
 - CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG  
 CCG CCC CCG CCC GCA AGC ACT GAC TGA  
 GTA ACG TC - 3' (Reverse : 配列番号 10)  
エクソン 5

5' - AAA CTG CTG GAG GAT GGT GAT T - 3'  
 (Forward : 配列番号 11)  
 5'  
 - CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG  
 CCG CCC CCG CCC GTT CAC TGT GAT ATT  
 TGC AAC AGG - 3' (Reverse : 配列番号 12)  
エクソン 6

5' - GGT TGA TGT TTG GGG TTC TTT GT  
 - 3' (Forward : 配列番号 13)  
 5'  
 - CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG  
 CCG CCC CCG CCC GTG TGG ATT CTT TTG  
 TGG ACT GAT T - 3' (Reverse : 配列番号 14)  
エクソン 7

5'  
 - CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG  
 CCG CCC CCG CCC GTT GTC CAG GGC GTG  
 CTA CAA A - 3' (Forward : 配列番号 15)  
 5' - AGA TTC ACA CAG CCC TCC AAG - 3'  
 (Reverse : 配列番号 16)  
エクソン 8

5'  
 - CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG  
 CCG CCC CCG CCC GTT AGC GAA TTG GAC  
 GAC AGA TG - 3' (Forward : 配列番号 17)  
 5' - TCT GGC ATT GAC CTT ATT GTG G - 3'  
 (Reverse : 配列番号 18)  
エクソン 3

5' - CTC CGC CAC TCT CCT GCA CAC A-3'  
(Forward : 配列番号 19)  
5' - GGG CCT CCA GCA GAA GTC AC-3'  
(Reverse : 配列番号 20)  
エクソン7  
5' - TTG TCC AGG GCG TGC TAC AAA-3'  
(Forward : 配列番号 21)

#### 【0044】

##### PCR增幅

各エクソンのPCR增幅は、抽出したゲノムDNA 0. 5  $\mu$ g/ $\mu$ L を用いて、各 0. 8  $\mu$ M のそれぞれのエクソンの合成オリゴヌクレオチドプライマー、各ヌクレオチド三リン酸 (dNTP) を 200  $\mu$ M 及び 3% ホルムアミドを含有する 50  $\mu$ L のPCR反応液 [10mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>] に、0.5 units のTaq DNA polymerase (Perkin Elmer 社) を加えて、PCR反応を行った。PCR反応の条件は、94°Cで30秒、54~68°Cで30秒、72°Cで1分間のサイクルを40回繰り返し、最後は72°Cで10分間反応を行い、目的のPCR産物を得た。PCR反応の確認は、5  $\mu$ L のPCR産物を、3%アガロースで電気泳動を行い、0.5  $\mu$ g/mLエチジウムプロマイドで染色を行い、確認した。

#### 【0045】

なお、CD38遺伝子の各エクソンの塩基配列について、エクソン1は、配列番号1の1~233番まで；エクソン2は、配列番号1の234~363番目まで；エクソン3は、配列番号1の364~498番目まで；エクソン4は、配列番号1の499~585番目まで；エクソン5は、配列番号1の586~659番目まで；エクソン6は、配列番号1の660~752番目まで；エクソン7は、配列番号1の753~839番目まで；エクソン8は、配列番号1の840~890番目までとして表されている。

#### 【0046】

##### DGGE法による遺伝子変異のスクリーニング

DGGE法は、Meyersらの方法に従い行った。すなわち、変性グリジエントポリアクリルアミドの作製は、177×220mmガラス板（宝酒造社）を使用し、変性剤の濃度が、各々のエクソンにおいて、最も適した濃度勾配を選択し、濃度勾配の幅が30%以内になるように設計し、作製した。各々の最適の濃度の作製は、0%デネイチャーラントの9%アクリルアミド（アクリルアミド：ビスアクリルアミド=37.5:1）TAE溶液（40mM Tris、20mM酢酸ナトリウム、2mM EDTA、pH 7.4）と80%デネイチャーラント（5.19M尿素、30%脱イオン化ホルムアミド）含有9%アクリルアミドTAE溶液で、グリジエントメーカーを用いて作製した。

#### 【0047】

DGGE法によるPCR産物の遺伝子変異スクリーニングは、上述のように得られた各エクソンのPCR産物（15  $\mu$ L）を500  $\mu$ L のチューブに分取し、真空乾燥機を用いて乾固し、10  $\mu$ L のローディング液 [20% Ficoll、1mM EDTA及び0.5% bromophenol blue 含有10mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.8)] を加えて、再溶解した後、ゲルに5  $\mu$ L アプライした。電気泳動は、1×TAE溶液（16L）を含むDGGE電気泳動槽（宝酒造社）で、溶液温度を60°Cに保温し、150V・16時間で泳動した。泳動後、0.5  $\mu$ g/mLエチジウムプロマイドで染色した後、紫外線下でDNA

断片を検出し、そのパターンを判定した。

【0048】

このように、DGGE法による、CD38遺伝子の各エクソン及びインtron領域における変異遺伝子のスクリーニングの結果、エクソン2に1つ(第1図)、エクソン3に2つ(第2図)、エクソン4に2つ(第3図)、エクソン7に1つ(第4図)、及びエクソン8に1つ(第5図)の野生型とは異なるバンドパターンを示し、異常バンドパターンであることが認められた。DGGE法における遺伝子異常のスクリーニングの結果、得られる異常バンドパターンは、得られた検体のPCR産物に野生型とは異なる塩基配列が含まれていることを示唆しており、その明確な塩基配列は別の方法で決定しなくてはならない。

【0049】

ダイレクトシークエンスによる塩基配列の決定

DGGE法で、異常パターンの認められたPCR産物について、オートシークエンサーを用いたダイレクトシークエンス法により塩基配列を解析した。すなわち、異常バンドパターンの検出されたPCR産物を、BigDye Terminator cycle sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin Elmer社)を用いて蛍光標識した後、ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems社)を用いて塩基配列を決定した。

【0050】

このオートシークエンサーを用いた、ダイレクトシークエンス法による塩基配列解析の結果、エクソン2に異常バンドパターンが検出された個体は、348番目の塩基に、野生型の塩基配列であるシトシン(C)の他にチミン(T)が検出され、この348番目の塩基に、CからTへの置換が生じていることが同定された(第6図)。このCからTへの一塩基置換により、116番目のアミノ酸に対するコドンが、ACCからACTに変化するが、対応するアミノ酸は変わらずスレオニン(Thr)であり、この一塩基置換によるアミノ酸の置換は生じていないことが明らかになった。つまり、この348番目の塩基における、CからTへの置換は、アミノ酸の置換を伴わない、いわゆるサイレント変異であり、異常バンドパターンが検出された個体においては、C348T変異のヘテロ接合体であった。

【0051】

エクソン3に、異常バンドパターンの検出された個体の一方は、418番目の塩基に、野生型の塩基配列であるCの他にTが検出され、このCからTの一塩基置換により、140番目のアミノ酸に対するコドンがCGGからTGGに変化し、その結果、この140番目のアミノ酸が、アルギニン(Arg)からトリプトファン(Trp)に置換が生じていることが同定された(第7図)。つまり、エクソン3に、異常バンドパターンが検出された個体は、上記の140番目のアミノ酸が置換する、いわゆるミスセンス変異のArg140Trp変異であり、Arg140Trp変異のヘテロ接合体であった。

【0052】

エクソン3に、異常バンドパターンが認められた個体のもう一方は、シークエンスの結果、418番目の塩基としてTのみが認められ、Arg140Trp変異のホモ接合体であった(第8図)。

【0053】

エクソン4に、異常バンドパターンの検出された個体の一方は、504番の塩基に、野生型の塩基配列であるAの他にCが検出され、このAからCの一塩基置換により、168番目のアミノ酸に対するコドンが、ATAからATCに変化していることが同定された(第9図)。上記の504番目の塩基における、AからCへの置換により、対応する168番目のアミノ酸は、イソロイシン(Ile)

のままであった。つまり、504番目の塩基に生じていたAからCへの置換は、アミノ酸の置換を伴わないサイレント変異であり、エクソン4に異常パターンが検出された個体は、A504C変異のヘテロ接合体であった。

#### 【0054】

エクソン4に、異常バンドパターンが認められたもう一方の個体は、504番目の塩基としてCのみが認められる、A504C変異のホモ接合体であった（第10図）。

#### 【0055】

エクソン7に、異常バンドパターンの検出された個体は、791番目の塩基に、野生型の塩基配列であるCの他にTが検出され、CからTへの一塩基置換により、264番目のアミノ酸に対するコドンがTCGからTTGに変化し、その結果、アミノ酸がセリン（Ser）からロイシン（Leu）に置換していることが同定された（第11図）。つまり、エクソン7に、異常バンドパターンが検出された個体は、上記の791番目の塩基におけるCからTの一塩基置換により、264番目のアミノ酸に置換が生ずる、Ser264Leu変異のヘテロ接合体であった。

#### 【0056】

エクソン8に、異常バンドパターンの検出された個体は、CD38遺伝子のエクソン8の上流に位置するイントロン7において、エクソン8のスプライシングに係わるアクセプター部位から、-28塩基上流に存在する塩基（配列番号22で示されるイントロン7の配列において39番目の塩基）に、野生型であるGの他にAが検出された（第12図）。つまり、このエクソン8において検出された異常バンドのパターンは、上記のアクセプター部位から、-28塩基上流に存在する塩基に、GからAへの塩基に置換が生じているイントロン7-28G/A変異のヘテロ接合体であった。

#### 【0057】

上述のごとく、糖尿病患者群において検出されたCD38遺伝子の遺伝子変異に関しては、2つのミスセンス変異である、エクソン3のArg140Trp変異とエクソン7のSer264Leu変異は、ともに対応するアミノ酸が変化することにより、CD38タンパク質の機能に異常を生じさせると考えられる。事実、Arg140Trp変異をもつCD38タンパク質は、ADP-ribosylcyclase活性、及びcyclic ADP-ribose（cADPR）hydrolase活性がともに低下していた（Diabetologia 1998 41:1024-1028）。

#### 【0058】

一方、Ser264Leu変異については、この264番のアミノ酸を含む、いくつかのアミノ酸からなる領域が、CD38タンパク質が酵素活性を発揮する際に、その基質となるNAD<sup>+</sup>と結合する上で重要な領域であることが分かっている。すなわち、上記の264番目のアミノ酸を含む領域のいずれかのアミノ酸が、他のアミノ酸に置換したCD38タンパク質は、その酵素活性が低下するか、又は失われるものと考えられる。

#### 【0059】

イントロン7-28G/A変異は、mRNAへのスプライシング時のラリーアート構造の形成に関する、いわゆる「枝分れ部位」のコンセンサス配列内に存在すると予測された〔遺伝子（下）東京化学同人〕。よって、イントロン7-28G/A変異は、CD38mRNAの生成に影響を及ぼし、これにより、異常タンパク質、あるいは異常mRNAが合成されている可能性がある。

#### 【0060】

CD38遺伝子変異の頻度解析

上述のごとく、検出同定されたCD38遺伝子における変異、すなわちエクソン2のC348T変異、エクソン3のArg140Trp変異、エクソン4のA504C変異、エクソン7のSer264Leu変異、及びイントロン7-28G/A変異について、糖尿病患者群及び非糖尿病患者群の両群を対象にして、その出現頻度を比較検討した。なお、3種類の変異、エクソン3のArg140Trp変異、エクソン7のSer264Leu変異及びイントロン7-28G/A変異は、いずれも一塩基の置換により、制限酵素の認識部位が変化することから、その判定には、PCR-RFLP法を用いた。また、エクソン2のC348T変異及びエクソン4のA504C変異は、前述したPCR-DGGE法により解析した。

#### 【0061】

##### PCR-RFLP法による遺伝子変異の解析

###### エクソン3 Arg140Trp変異の検出法

抽出したゲノムDNA 0.5 μL

を用いて、配列番号19及び20のオリゴヌクレオチドプライマーで、上述のごとく、PCR反応を行い、目的の381bpのPCR産物を得た。この10 μLのPCR産物を、制限酵素TspRI (New England Biolabs社) 2.5 units

で、65°Cで一晩消化処理をした後、3%アガロースで電気泳動を行い、エクソン3 Arg140Trp変異の検出をした。すなわち、野生型の場合、381 bpのDNA断片は、311 bpと70 bpの2つの断片に切断されるが、Arg140Trp変異を有する場合、228 bpと83 bpと70 bpの3つの断片に切断されることにより判定される(第13図)。

#### 【0062】

###### エクソン7 Ser264Leu変異の検出法

抽出したゲノムDNA 0.5 μL

を用いて、配列番号21及び17のオリゴヌクレオチドプライマー及び最終濃度が3%になるようにホルムアミドを加えたPCR溶液で、上述のごとく、PCR反応を行い、目的の274bpのPCR産物を得た。この10 μLのPCR産物を、制限酵素TaqI (New England Biolabs社) 5 units

で、65°Cで一晩消化処理をした後、3%アガロースで電気泳動を行い、エクソン7 Ser264Leu変異の検出をした。すなわち、野生型の場合、274 bpのDNA断片は、149 bpと125 bpの2つの断片に切断されるが、Ser264Leu変異を有する場合、全く切断されないことにより判定される(第14図)。

#### 【0063】

###### イントロン7-28G/A変異の検出法

抽出したゲノムDNA 0.5 μL

を用いて、配列番号17及び18のオリゴヌクレオチドプライマー及び最終濃度が3%になるようにホルムアミドを加えたPCR溶液で、上述のごとく、PCR反応を行い、目的の297bpのPCR産物を得た。この10 μLのPCR産物を、制限酵素Tru9I (Promega社) 2 units

で、65°Cで一晩消化処理をした後、3%アガロースで電気泳動を行い、イントロン7-28G/A変異の検出をした。すなわち、野生型の場合、297 bpのDNA断片は、全く切断されないが、イントロン7-28G/A変異を有する場合、220 bpと77 bpの2つの断片に切断されることにより、判定される(第15図)。

#### 【0064】

###### 各遺伝子変異の出現頻度

D G G E 法による遺伝子解析を実施した 240 例を含め、糖尿病患者群 757 例について解析した。

エクソン 2 の C 348 T 変異は、2 例（2 例 / 240 例）に変異が検出され、その遺伝子変異頻度は 0.8% であった。エクソン 3 Arg 140 Trp 変異は、ヘテロ接合体が 27 例（27 例 / 757 例）に、同変異のホモ接合体が 1 例（1 例 / 757 例）に検出され、その遺伝子変異頻度は 3.7% であった。エクソン 4 の A504C 変異は、ヘテロ接合体が 58 例（58 例 / 240 例）、同変異のホモ接合体が 4 例（4 例 / 240 例）に変異が検出され、その遺伝子変異頻度は 25.8% であった。エクソン 7 Ser 264 Leu 変異は、ヘテロ接合体が 9 例（9 例 / 757 例）に検出され、その遺伝子変異頻度は 1.2% であった。イントロン 7-28G/A 変異は、ヘテロ接合体が 9 例（9 例 / 757 例）に検出され、その遺伝子変異頻度は 1.2% であった。

#### 【0065】

一方、非糖尿病者 205 例を解析したところ、エクソン 3 Arg 140 Trp 変異は、ヘテロ接合体が 3 例（3 例 / 205 例）に、イントロン 7-28G/A 変異は、ヘテロ接合体が 2 例（2 例 / 205 例）に検出され、エクソン 7 Ser 264 Leu 変異を有するものは、205 例の非糖尿病群には認められなかった。

#### 【0066】

また、C348T 変異を有するヘテロ接合体 2 例のうち、1 例は、A504C 変異のヘテロ接合体であり、他の 1 例は、A504C 変異が認められない野生型の塩基配列であった。そして、58 例の A504C 変異ヘテロ接合体のうち、57 例は、他の変異を共有していなかった。すなわち、この結果から、C348T 変異と A504C 変異は、それぞれ独立した対立遺伝子上に存在すると考えられる。

#### 【0067】

上記のごとく、インスリン産生細胞において、インスリンの分泌に密接に関与するタンパク質である CD38 タンパク質をコードする遺伝子の変異を解析し、さらに、その解析の結果、同定された遺伝子変異について、糖尿病群と非糖尿病群における遺伝子変異の頻度を解析した。その結果、少なくとも CD38 タンパク質の発現量及びその機能を欠失すると考えられる変異において、糖尿病群において、エクソン 3 Arg 140 Trp 変異、エクソン 7 Ser 264 Leu 変異及びイントロン 7-28G/A 変異を有する遺伝子変異の頻度は、6.1%（46 例 / 757 例）であり、これは、非糖尿病群における上記遺伝子変異の頻度が 2.4%（5 例 / 205 例）であるのに比べると、明らかに高頻度であることが証明された。この結果は、単一の遺伝子変異による糖尿病の原因遺伝子異常であるミトコンドリア遺伝子異常全体の頻度が、糖尿病群において約 2% であるという結果を鑑みると、CD38 タンパク質をコードする遺伝子の異常の頻度が、糖尿病群において 6.1% であるということは、CD38 遺伝子の異常は、糖尿病患者において極めて高頻度に出現しており、これまでに報告されている他の遺伝子の異常と比較しても際立って高頻度である。遺伝子の変異は、国や地域によって集積や偏りがあることは、よく知られており、今後、対象を拡大して解析を進めることにより、上記の 3 種の遺伝子変異の出現頻度が更に増加すること、あるいは、上記の 3 種の遺伝子変異以外の CD38 遺伝子の遺伝子変異が見出されることが考えられ、CD38 遺伝子全体の異常による糖尿病患者の特定数は、さらに増加する可能性がある。従って、上記の 3 種の遺伝子変異、あるいはさらに追加されるであろう新たな遺伝子変異は、それぞれ個別に検出されるべきものではなく、CD38 遺伝子全体としてとらえることにより、糖尿病発症危険因子の検出マーカーとしての有用性が向上するものである。

#### 【0068】

【発明の効果】

本発明により、糖尿病発症危険因子の、遺伝子を用いた検出手段が提供される

WHAT IS CLAIMED IS:

【請求項 1】 CD 3 8 遺伝子の遺伝子変異を検出することにより、被検者における糖尿病発症危険因子を検出する、糖尿病発症危険因子の検出方法。

【請求項 2】 遺伝子変異が認められる部位が、CD 3 8 遺伝子によってコードされるCD 3 8 タンパク質の140番目のアルギニンをコードする部位、同264番目のセリンをコードする部位及びイントロン7の-28番目のグアニンから選ばれる1種又は2種以上である、請求項1記載の糖尿病発症危険因子の検出方法。

### Abstract of the Disclosure

もともとは、ヒトリンパ球表面マーカーの一つとして同定されていたタンパク質である、CD38タンパク質をコードする遺伝子を、上記の危険遺伝子として、その遺伝子の変異を検出することにより、被検者における糖尿病発症危険因子を検出する。

H:\DOCS\KOAYMSHIM6.JP.DOC  
013101